



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
NÚCLEO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

Fernanda Silva de Melo Nobre

Avaliação ecotoxicológica dos metais-traço cobre e zinco, isolados e  
em mistura, para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*

São Cristóvão, SE

2015

**Fernanda Silva de Melo Nobre**

Avaliação ecotoxicológica dos metais-traço cobre e zinco, isolados e em mistura, para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Novelli

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Núcleo de Engenharia Ambiental, da Universidade Federal de Sergipe, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

São Cristóvão, SE

2015

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por esta vitória, pois sei que seria impossível sem a sua divina ajuda e vontade. O meu coração exalta de gratidão e alegria por esta graça alcançada;

Aos meus pais, Cida e Dão, pelo amor, incentivo e apoio incondicional;

A toda minha família que com muito carinho e apoio não mediram esforços para que eu chegasse a essa etapa da minha vida;

À minha orientadora, Prof<sup>ca</sup> Dr<sup>a</sup> Andréa Novelli, pelos ensinamentos, paciência, confiança e apoio na elaboração deste trabalho;

A todos os professores do Núcleo de Engenharia Ambiental que desempenharam com dedicação as aulas ministradas;

Aos amigos do Grupo de Estudos de Ecossistemas Aquáticos (GEEA), pela ajuda na realização desse trabalho;

Aos amigos e colegas que participaram de alguma forma na construção e realização deste tão realizado sonho;

À família Guerra pelo carinho, atenção e apoio, em especial a Carol por fazer parte de toda essa trajetória;

E a todas as pessoas que de alguma forma influenciaram a minha vida para que este momento, em especial, pudesse se realizar.

## RESUMO

As atividades antrópicas têm provocado o despejo de inúmeras substâncias químicas sintéticas e naturais, sendo os ecossistemas aquáticos os mais susceptíveis à exposição a tais agentes tóxicos. A elevada concentração de metais-traço no meio aquático apresenta-se como uma das formas de contaminação química mais grave, justamente por serem elementos não biodegradáveis. Nesse contexto, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos agudo dos metais-traço cobre e zinco, isoladamente e em mistura, para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* e comparar esses efeitos com os preditos por meio dos modelos de Adição de Concentração e Ação Independente. Os resultados obtidos demonstraram que as concentrações efetivas medianas (CE50) de zinco para ambos os organismos-teste foram inferiores ao limite máximo ( $180 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) estabelecido pela legislação vigente, Resolução CONAMA nº 357/2005, para corpos d'água de classe 2, quando avaliados de forma isolada, demonstrando que o valor estabelecido por tal resolução pode não ser adequado para a manutenção da biota aquática. Apenas para *Ceriodaphnia silvestrii*, os valores observados foram também inferiores ao limite máximo para cobre dissolvido ( $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) estabelecido pela resolução, mostrando que o valor definido para a manutenção da biota aquática pode não está adequado, levando em consideração o efeito isolado. Já o modelo de ação que melhor descreve o efeito da mistura sobre os organismos-teste foi o de Ação Independente, sendo a toxicidade em nível de dose, ou seja, ocorrendo antagonismo em baixas doses e sinergismo em doses elevadas.

**Palavras-chave:** testes de toxicidade. zooplâncton. bioindicadores. sinergismo. antagonismo.

## ABSTRACT

The anthropogenic activities have caused the discard of countless synthetic and natural chemicals, and the aquatic ecosystems are the most susceptible to the exposure to such toxic agents. The high concentration of trace metals in the aquatic environment presents itself as one of the most serious forms of chemical contamination, because they are non-biodegradable elements. In this context, the main objective of this paper was to assess the acute ecotoxicological effects of the trace metals copper and zinc, individually and in mixture, to *Daphnia similis* and *Ceriodaphnia silvestrii*, and compare these effects with those predicted by the models of concentration addition and independent action. The results showed that the median effective concentration of zinc for both test organisms were lower than the maximum limit ( $180 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) set by law, CONAMA n<sup>o</sup> 357/2005, to water bodies of class 2, when individually evaluated, showing that the set value may not be suitable for the maintenance of aquatic biota. Just for *Ceriodaphnia silvestrii* the observed values were lower than the limit for dissolved copper ( $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) established by law, showing that the value set for the maintenance of aquatic biota may not be suitable, taking into account the isolated effect. The model of action that best describes the effect of the mixture upon the test organisms was the independent action, and the toxicity occurs at dose level, in other words, occurring antagonism at lower doses and synergism on high doses.

**Key words:** toxicity tests. zooplankton. bioindicator. synergism. antagonism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representativo da distribuição de metais-traço em diferentes compartimentos no ambiente aquático e das interações entre os ecossistemas aquático e terrestre. Fonte: Adaptado (SALOMONS & FORSTNER, 1984). .....	13
Figura 2 - Visão geral de uma fêmea de <i>Daphnia similis</i> (Aumento de 16x). Fonte: Beatrice, 2004. ....	21
Figura 3 - Visão geral de uma fêmea de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> (Aumento de 100x). Fonte: Santos, 2004.....	21
Figura 4 - A figura ilustra as culturas de <i>Daphnia similis</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> , mantidas na sala de cultivo do Grupo de Estudos de Ecossistemas Aquáticos (GEEA), na Universidade Federal de Sergipe. Fonte: Autor.....	23
Figura 5 - Resultados dos testes de sensibilidade para <i>Daphnia similis</i> ao cloreto de sódio como substância de referência, expressos em g.L <sup>-1</sup> (Carta Controle de 2015).....	30
Figura 6 - Resultados dos testes de sensibilidade para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> ao cloreto de sódio como substância de referência, expressos em g.L <sup>-1</sup> (Carta Controle de 2015). ....	31
Figura 7 - Resultados dos testes de toxicidade aguda para <i>Daphnia similis</i> ao cobre, expressos em µg.L <sup>-1</sup> . ....	32
Figura 8 - Resultados dos testes de toxicidade aguda de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> ao cobre, expressos em µg.L <sup>-1</sup> . ....	33
Figura 9 - Resultados dos testes de toxicidade aguda para <i>Daphnia similis</i> ao zinco, expressos em µg.L <sup>-1</sup> . ....	37
Figura 10 - Resultados dos testes de toxicidade aguda de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> ao zinco, expressos em µg.L <sup>-1</sup> . ....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Apresentação das concentrações-teste utilizadas nos bioensaios de toxicidade aguda do cobre para <i>Daphnia similis</i> , expressos em $\mu\text{g.L}^{-1}$ .....	25
Tabela 2 - Apresentação das concentrações-teste utilizadas nos bioensaios de toxicidade aguda do cobre para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> , expressos em $\mu\text{g.L}^{-1}$ .....	26
Tabela 3 - Apresentação das concentrações-teste utilizadas nos bioensaios de toxicidade aguda do zinco para <i>Daphnia similis</i> , expressos em $\mu\text{g.L}^{-1}$ .....	26
Tabela 4 - Apresentação das concentrações-teste utilizadas nos bioensaios de toxicidade aguda do zinco para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> , expressos em $\mu\text{g.L}^{-1}$ .....	27
Tabela 5 - Apresentação das concentrações-teste utilizadas nos bioensaios de toxicidade da mistura dos metais-traço cobre e zinco para <i>Daphnia similis</i> . ....	27
Tabela 6 - Apresentação das concentrações-teste utilizadas nos bioensaios de toxicidade da mistura dos metais-traço cobre e zinco para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	28
Tabela 7 - Valores das CE50;48h ( $\text{g.L}^{-1}$ NaCl) dos testes de sensibilidade para <i>Daphnia similis</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> ao cloreto de sódio obtidos por diversos autores, apresentando seus respectivos valores de pH e de dureza utilizados durante os testes. ....	31
Tabela 8 - Apresentação dos valores de CE50;48h e de seus respectivos intervalos de confiança referentes aos testes de toxicidade aguda ao cobre para <i>Daphnia similis</i> .....	32
Tabela 9 - Apresentação dos valores de CE50;48h e de seus respectivos intervalos de confiança referentes aos testes de toxicidade aguda ao cobre para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> . ....	33
Tabela 10 - Valores das CE50;48h ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ Cu) dos testes de toxicidade aguda para <i>Daphnia sp.</i> e <i>Ceriodaphnia sp.</i> ao cobre obtidos por diversos autores, apresentando seus respectivos valores de pH e de dureza utilizados durante os testes. ....	36
Tabela 11 - Apresentação dos valores de CE50;48h ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ Zn) e de seus respectivos intervalos de confiança referentes aos testes de toxicidade aguda com zinco para <i>Daphnia similis</i> .....	36
Tabela 12 - Apresentação dos valores de CE50;48h ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ Zn) e de seus respectivos intervalos de confiança referentes aos testes de toxicidade aguda com zinco para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> . ....	37

Tabela 13 - Valores de CE50;48h ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ Zn) dos testes de toxicidade aguda para <i>Daphnia sp.</i> e <i>Ceriodaphnia sp.</i> ao zinco obtidos por diversos autores, apresentando seus respectivos valores de pH e de dureza utilizados durante os testes. ....	39
Tabela 14 - Resultados da análise dos testes de toxicidade aguda da mistura binária de cobre e zinco para <i>Daphnia similis</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> , utilizando os conceitos de modelos de ação (Adição de Concentração e Ação Independente). ....	40



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
1.1. Metais	11
1.1.1. Toxicidade dos Metais-traço	11
1.1.2. Zinco	15
1.1.3. Cobre	16
1.2. Ecotoxicologia	17
1.2.1. Efeitos Toxicológicos das Misturas de Substâncias	19
1.2.2. Organismo-teste	20
1.2.3. Teste de Sensibilidade	21
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>23</b>
3.1. Cultivo, Alimentação e Bioensaio de Toxicidade	23
3.2. Teste de Sensibilidade	24
3.3. Bioensaio de Toxicidade	25
3.3.1. Soluções-teste com Cobre	25
3.3.2. Soluções-teste com Zinco	26
3.3.3. Estudos Preliminares da Mistura dos Metais-traço Cobre e Zinco	27
3.4. Bioensaio de Toxicidade Aguda	28
3.5. Tratamento Estatístico	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>30</b>
4.1. Teste de Sensibilidade	30
4.2. Bioensaio de Toxicidade Aguda	32
4.2.1. Sensibilidade dos Organismos-teste ao Cobre	32
4.2.2. Sensibilidade dos Organismos-teste ao Zinco	36
4.2.3. Sensibilidade dos Organismos-teste à Mistura dos Metais-traço Cobre e Zinco	39
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>43</b>
<b>APÊNDICE A</b>	<b>49</b>
<b>APÊNDICE B</b>	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A água é um recurso imprescindível para a sobrevivência dos seres vivos. E para promover o desenvolvimento socioeconômico, a sociedade humana tem produzido contínua e sistemática deterioração da qualidade hídrica, além da diminuição da sua disponibilidade. Esses fatores estão atrelados, principalmente, pela ocupação desordenada, pela falta de saneamento básico, pela supressão da vegetação marginal, do desmatamento, da poluição atmosférica, do uso inadequado do solo e da construção de barragens e reservatórios e pelas mudanças climáticas (TUNDISI & MATSUMURA-TUNDISI, 2011).

A degradação dos recursos hídricos pode ser causada por contaminantes biológicos (tais como coliformes fecais), físicos (temperatura e radiação) e químicos (substâncias químicas naturais ou sintéticas). O processo de contaminação em geral ocorre quando os contaminantes não são assimilados, transformados ou eliminados pelos seres vivos ou por processos abióticos (SISINNO & OLIVEIRA-FILHO, 2013).

A contaminação química é considerada como uma das causas fundamentais para a diminuição da qualidade dos corpos d'água. Com o advento da revolução industrial ocorreu um aumento significativo nos níveis, bem como no número de substâncias químicas presentes no meio ambiente, especialmente, nos ecossistemas aquáticos. Uma das formas mais graves de contaminação química é a contaminação por metais-traço, pois são elementos não biodegradáveis e a depender da concentração e da espécie são potencialmente tóxicos aos organismos aquáticos e, indiretamente, trazem riscos à saúde humana via cadeia alimentar (TUNDISI & MATSUMURA-TUNDISI, 2011; GAUTAM et al., 2014).

Os metais-traço como o ferro, zinco, cobre, cromo, selênio e manganês são classificados como metais essenciais, pois em baixas concentrações desempenham importantes funções biológicas nos processos metabólicos. Já os metais não essenciais como o mercúrio, níquel, cádmio, chumbo, arsênio e alumínio são altamente tóxicos mesmo em pequenas concentrações, uma vez que não são utilizados em processos biológicos, podendo bioacumular e biomagnificar na cadeia trófica (VAZ & LIMA, 2003; GAUTAM et al., 2014; ESTEVES, 1998).

A toxicidade por metais depende não só da concentração, mas também de fatores biológicos e das condições físicas e químicas da água. Os fatores biológicos, em geral, referem-se ao tipo, idade, tempo de exposição e a vias de contaminação do organismo. Já as

características físicas e químicas da água, como, por exemplo, pH, temperatura, dureza, alcalinidade, matéria orgânica e partículas sólidas suspensas podem influenciar na especiação química dos metais, o que consequentemente interferem na biodisponibilidade e toxicidade dos mesmos (SISINNO & OLIVEIRA-FILHO, 2013; JO et al., 2010; WOOD, 2011; BJERRGAARD et al., 2015).

Diversos estudos realizados têm demonstrado que elevadas concentrações dos metais cobre e zinco nos ecossistemas aquáticos causou a toxicidade em microcrustáceos, especialmente, em Cladocera, podendo inviabilizar a sobrevivência desses organismos (HYNE et al., 2005; YIM et al., 2006; NADDY et al., 2015). Além disso, nos ecossistemas aquáticos são despejados diariamente inúmeros agentes tóxicos, tais como pesticidas e fármacos, advindos de diferentes fontes antropogênicas, expondo os organismos aquáticos a misturas de substâncias químicas cuja toxicidade combinada pode provocar efeitos diferenciados, tais como interações antagônicas, aditivas e sinérgicas (BARROSO, 2009; CEDERGREEN et al., 2008).

Nesse contexto, a ecotoxicologia aquática apresenta-se como uma importante ferramenta para prever os efeitos toxicológicos das substâncias químicas naturais ou sintéticas de modo isolado ou em mistura, juntamente, com as análises dos parâmetros físico-químicos do meio, para melhor avaliar impactos ambientais causados aos ecossistemas e prever os riscos ambientais (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

## **1.1. Metais**

### **1.1.1. Toxicidade dos Metais-traço**

Os metais-traço são elementos naturais encontrados na crosta terrestre, ocorrendo em baixas concentrações da ordem de grandeza de partes por bilhão (ppb) ou partes por milhão (ppm) (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). Diversos autores conceituam e defendem o uso do termo técnico “metal-traço” ou “elemento-traço” que englobam elementos que apresentam diferentes propriedades químicas e ocorrem em baixas concentrações, em detrimento ao termo “metal pesado” que refere-se a metais e não-metais potencialmente tóxicos, não apresentando nenhuma definição química oficialmente estabelecida pela *International Union of Pure and*

*Applied Chemistry* (IUPAC) (MARTINS, et al., 2011; GUILHERME et al., 2005; a, G. et al., 2009).

Alguns metais-traço são considerados micronutrientes ou elementos essenciais por apresentam importantes funções biológicas, mas quando presentes no meio em elevadas concentrações esses elementos podem causar danos aos ecossistemas (GUILHERME et al., 2005; ESTEVES & GUARIENTO, 2011). Segundo ESTEVES & GUARIENTO (2011), um determinado metal-traço pode estar presente no meio em concentrações traço, mas sob determinadas condições, esse mesmo elemento pode apresentar-se em elevadas concentrações.

Os elementos-traço são introduzidos naturalmente pelas atividades vulcânicas, intemperismo e a erosão. Entretanto, atividades de mineração, agrícolas, processos industriais e o despejo de efluentes são as principais fontes que contribuem para o aumento da concentração e da toxicidade dos metais-traço no meio ambiente, podendo causar efeitos deletérios à saúde humana, à sobrevivência dos organismos e à diminuição da biodiversidade (AZEVEDO & CHASIN, 2003; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). Além disso, as intensas extrações dos metais têm alterado a ciclagem e diminuído as reservas dos mesmos (SALOMONS & FORSTNER, 1984).

No ambiente aquático, os metais-traço podem estar distribuídos na coluna d'água, nos sedimentos, em materiais particulados suspensos e na água intersticial (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008), sendo que estes reservatórios interagem entre si e também com os ecossistemas terrestres, como é demonstrado na Figura 1 (SALOMONS & FORSTNER, 1984).

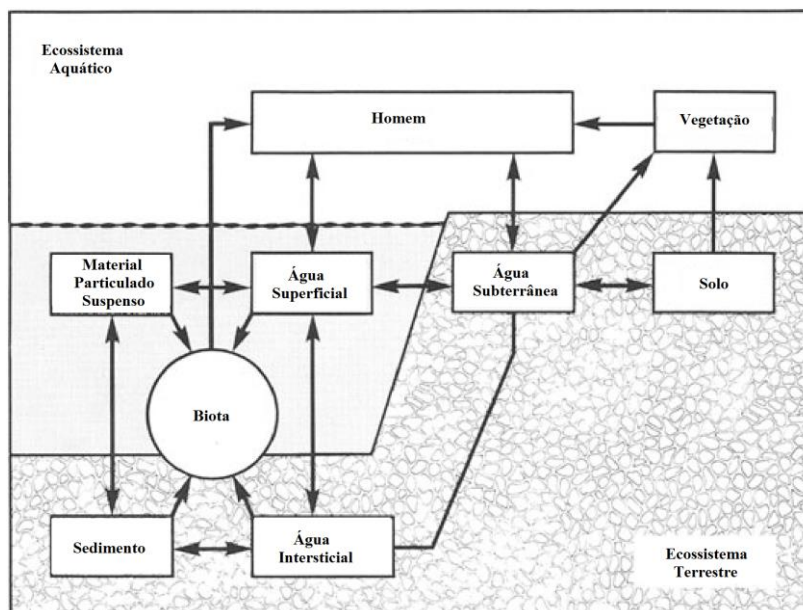


Figura 1- Esquema representativo da distribuição de metais-traço em diferentes compartimentos no ambiente aquático e das interações entre os ecossistemas aquático e terrestre. Fonte: Adaptado (SALOMONS & FORSTNER, 1984).

O sedimento é considerado o principal depósito e fonte de metais-traço em ecossistemas aquáticos, pois os íons metálicos livres são principalmente adsorvidos pelos sedimentos, além de sofrerem reações de troca iônica com argilas e formarem complexos (BJERREGAARD et al., 2015). Este reservatório interage continuamente com a coluna d'água, havendo um grande potencial de remobilização e liberação de contaminantes (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

A especiação dos metais-traço é definida como a forma química que esses se encontram distribuídos no meio ambiente e, exerce controle na biodisponibilidade, bioacumulação e toxicidade dos metais nos reservatórios (SALOMONS & FORSTNER, 1984; BJERREGAARD et al., 2015). A especiação pode ser classificada como: física, que se refere às formas dissolvida, coloidal e particulada; e química, que está relacionada às espécies em soluções, incluindo os metais complexados e não-complexados e em diferentes estados de oxidação (TWISS et al., 2001). De modo geral, quanto maior a concentração do metal livre, maior a sua biodisponibilidade, consequentemente, maior o seu potencial tóxico e/ou sua bioacumulação. Portanto, a especiação dos metais-traço é um fator extremamente importante a ser considerado em estudos ecotoxicológicos aplicados em ambientes aquáticos (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Outras variáveis que influenciam consideravelmente a toxicidade dos metais-traço, além da especiação, são os fatores abióticos e bióticos. Os principais fatores abióticos são:

- pH: quanto menor o pH, maior a toxicidade para a maioria dos metais, a exemplo do cobre e do zinco (WILDE et al., 2006);
- Temperatura: o aumento da temperatura contribui para a solubilização de algumas substâncias, resultando no aumento da toxicidade (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008);
- Dureza: seu acréscimo provoca a diminuição da toxicidade dos metais-traço, devido ao aumento de cátions polivalentes,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , que podem interferir na especiação e na assimilação dos metais (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008);
- Oxigênio dissolvido: a toxicidade de determinados metais aumenta com a diminuição do oxigênio dissolvido (Lloyd, 1961 apud EMBRAPA, 2013);
- Matéria orgânica: atua como um agente natural quelante que adsorve os metais-traço, tornando-os menos biodisponíveis e contribuindo para a diminuição da toxicidade (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008);
- Sulfatos e sulfetos: tendem a promover a precipitação dos metais em solução, diminuindo a biodisponibilidade dos mesmos (MAGALHÃES et al., 2015; LANDNER & REUTHER, 2005).

Com relação aos fatores bióticos destacam-se: a espécie, pois a sensibilidade a uma substância varia de acordo com cada espécie, podendo apresentar resultados de toxicidade diferentes; a idade, pois estudos mostram que indivíduos jovens são mais sensíveis em relação aos indivíduos adultos; tempo de exposição do organismo à substância, pois pode influenciar no processo de bioacumulação; vias de contaminação, que variam de acordo com cada organismo, como por exemplo os zooplânctons, cuja a contaminação é dada pela absorção direta através da água e pela alimentação (MAGALHÃES et al., 2015); tamanho, pois quanto maior o tamanho do indivíduo, maior a sua superfície de contato (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Além disso, alguns organismos, incluindo o ser humano, possuem a capacidade de autoregulação da concentração de metais-traço considerados como micronutrientes, como o zinco e o cobre, através do processo de homeostase, diminuindo o efeito de toxicidade pelo metal. Este processo envolve basicamente a regulação da absorção, do transporte intracelular e da fixação/armazenamento do metal com base na concentração deste no meio. E à medida que os metais-traço atingem elevadas concentrações, ocorre o comprometimento desses mecanismos, causando danos aos organismos expostos (ATSDR, 2005)

Em geral, a concentração de metais-traço nos organismos é maior que a concentração nas águas do entorno, mas inferior à concentração em sedimentos (WHO, 2004). E devido aos metais serem considerados elementos conservativos, estes possuem a tendência de serem bioacumulados e biomagnificados pelos organismos, como os invertebrados aquáticos, independentemente de serem metais essenciais ou não (RAINBOW, 2007). Sendo assim, diversos estudos vêm sendo realizados para avaliar os efeitos da toxicidade dos metais-traço na sobrevivência de organismos aquáticos através da realização de bioensaios. Um dos organismos-teste vastamente utilizados para a realização de bioensaios são os organismos zooplancônicos, que são caracterizados por serem organismos sensíveis e por exercerem uma importante função na cadeia alimentar (BARATA et al., 2002).

### **1.1.2. Zinco**

O zinco é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre, ocorrendo comumente no estado de oxidação bivalente ( $\text{Zn}^{2+}$ ). Devido à sua tendência a reagir com outros elementos, tais como cloro, oxigênio e enxofre, o zinco geralmente apresenta-se na forma de compostos (AZEVEDO & CHASIN, 2003; EPA, 2005). Sendo assim, este é raramente encontrado na natureza em seu estado elementar ou metálico (ATSDR, 2005).

O sulfeto de zinco é considerado o minério de zinco mais encontrado na natureza, além de ser a principal matéria prima na produção do zinco metálico (WHO, 2001), que pode ser utilizado na fabricação de ligas, baterias e no revestimento de outros metais para evitar a corrosão. Já os compostos de zinco podem ser utilizados na produção de tintas, cerâmicas, borracha e medicamentos, dentre outros (ATSDR, 2005).

O aumento da concentração de zinco no ar, na água, no solo, nos alimentos e na biota é decorrente, principalmente, das atividades de mineração, da produção de aço, da queima de carvão e de resíduos sólidos, do uso fertilizantes e pesticidas, do despejo de efluentes domésticos e da purificação de zinco, chumbo e cádmio (ATSDR, 2005; WHO, 2001). Apesar do zinco ser considerado um micronutriente essencial para os seres vivos, por exercer importantes funções metabólicas, ele pode causar efeitos tóxicos aos organismos quando em elevadas concentrações (WHO, 2001).

O transporte e a distribuição do zinco no meio ambiente depende da sua especiação química (influenciada pelo pH, matéria orgânica e dureza da água), que afeta diretamente na

sua biodisponibilidade. O pH apresenta-se como o principal fator determinante na solubilidade do zinco em água que, em geral, em pH ácido pode estar na forma iônica, e em pH acima de 8 pode formar precipitado, sendo adsorvido por compostos orgânicos e inorgânicos e, conseqüentemente, estando menos biodisponível. A presença de matéria orgânica também influencia a biodisponibilidade do zinco, pois este é adsorvido nas partículas de matéria orgânica, em geral em pH acima de 6,5, diminuindo a quantidade de íons livres na coluna d'água (AZEVEDO & CHASIN, 2003; WHO, 2001). Este fenômeno também pode ocorrer pela associação do zinco com outros ligantes tais como sulfeto, argilominerais, óxidos de ferro e manganês, em condições físico-químicas específicas. Além disso, a diminuição da dureza pode causar um decréscimo da biodisponibilidade do zinco, devido à competição entre cátions bivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) por receptores bioquímicos (WHO, 2001; HYNE et al., 2005).

### 1.1.3. Cobre

O cobre apresenta-se na natureza na sua forma elementar ou metálica e pode ser encontrado, principalmente, nos minerais como a malaquita ( $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ ), calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) e a calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) (ATSDR, 2004). Do mesmo modo que outros metais, o cobre é transportado através da precipitação e do escoamento da água (AZEVEDO & CHASIN, 2003).

As principais fontes naturais do cobre são provenientes de atividades vulcânicas, intemperismo, erosão, lixiviação, incêndios florestais e névoas aquáticas. Já as fontes antropogênicas são mineração, atividades de fundição, incineração (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008), queima de combustíveis fósseis, despejos de efluentes domésticos e industriais, depósitos de resíduos sólidos e produção de madeira (ATSDR, 2004). O cobre é considerado um dos metais mais importantes devido a sua elevada condutividade térmica e elétrica, ductilidade, durabilidade, maleabilidade e baixa corrosividade. Por apresentar essas propriedades, o cobre é muito utilizado na fabricação de fiações elétricas, tubos, válvulas, acessórios, moedas, utensílios de cozinha e materiais de construção e de ligas metálicas, como latão e bronze. Além disso, o sulfato de cobre é utilizado na fabricação de fertilizantes, fungicidas, algicidas, bactericidas, tintas, anti-incrustantes e suplementos nutricionais (AZEVEDO & CHASIN, 2003; WHO, 2004).

O cobre é considerado um micronutriente vital para o ser humano, plantas e animais, sendo utilizado em quantidades reduzidas. Assim como o zinco, o cobre possui um elevado



potencial de bioacumulação, porém não apresenta considerável biomagnificação, pois a concentração do cobre decresce à medida que atinge níveis tróficos mais elevados. A toxicidade do cobre é proporcional a sua biodisponibilidade, ou seja, quanto maior a concentração de íons livres, maior a biodisponibilidade do cobre, consequentemente, maior os efeitos toxicológicos sobre os organismos. Em geral, a toxicidade do cobre é reduzida com o aumento da dureza da água devido à competição entre cátions por receptores bioquímicos (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Em ambientes aquáticos, o íon cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) é a principal forma solúvel do cobre, que é dificilmente encontrado em seu estado livre, pois é rapidamente complexado (por ligantes orgânicos e inorgânicos), adsorvido ou precipitado a depender da composição físico-química da água. Ao ser despejado na água o cobre é adsorvido na ordem decrescente de: óxido hidratado de manganês > matéria orgânica > óxido hidratado de ferro > aluminossilicatos > argila (montmorillonita) (ATSDR, 2004).

## 1.2. Ecotoxicologia

A ecotoxicologia é uma ciência oriunda da integração dos conceitos tanto da ecologia quanto da toxicologia. A ecologia refere-se ao estudo dos seres vivos e da sua interação com meio ambiente. Enquanto que a toxicologia tem como objetivo identificar os efeitos nocivos causados por determinada substância sobre os organismos em específicas condições de exposição (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). Portanto, a ecotoxicologia avalia e prevê os efeitos de substâncias à biota.

O termo ecotoxicologia foi inicialmente definido pelo toxicologista René Truhaut, em junho de 1969, durante um encontro do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo. Posteriormente, a ecotoxicologia foi redefinida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os ecossistemas, integrando os estudos sobre as fontes de emissão e a distribuição dos contaminantes nos ecossistemas, principalmente, na cadeia alimentar e prevendo as possíveis consequências ao ser humano (TRUHAUT, 1977).

A ecotoxicologia aquática é uma importante ferramenta no controle da qualidade da água, pois é uma ciência que avalia os efeitos adversos de uma ou mais substâncias sobre os ecossistemas aquáticos com o objetivo de protegê-los (HOFFMAN et al, 2002; SILVA et al.

2015). Portanto, a ecotoxicologia aquática, pode ser utilizada no estabelecimento de padrões de qualidade da água por meio da definição dos limites para a emissão de substâncias químicas no ambiente aquático e de medidas de mitigação adequadas (BUSS et. al., 2008).

Os testes de toxicidade possuem uma vasta aplicabilidade tais como no estudo da toxicidade de pesticidas (OLIVEIRA-FILHO et al., 2004), efluentes industriais e domésticos (YI et al., 2010) metais-traços (HARICHANDAN et al., 2013), nanopartículas (TAVARES et al., 2014), fármacos (BONA et al., 2014) e de amostras ambientais (água superficiais, subterrânea e sedimentos) (BALIARSINGH et al., 2010). Para a realização desses testes são utilizados organismos vivos sensíveis que são diretamente afetados pela presença de substâncias em níveis nocivos, considerando as condições físico-químicas do meio em estudo (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Diversos órgãos e associações internacionais, como *Environment Canada*, *United States Environmental Protection Agency* (U.S. EPA), *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) e a *International Organization for Standardization* (ISO) desenvolveram métodos padronizados para a realização de testes de toxicidade (NIKINMAA, 2014; COSTA & OLIVI, 2008). No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) também elaboram testes de toxicidade padronizados (COSTA & OLIVI, 2008).

Os testes de toxicidade ou bioensaios podem ser classificados em agudos e crônicos. O teste agudo avalia os efeitos letais sobre o organismo-teste utilizando os critérios de mortalidade e de imobilidade em um curto tempo de exposição, geralmente, num intervalo de 48 a 96 horas. O resultado deste ensaio pode ser expresso em concentração efetiva ou letal mediana (CE50 ou LC50) que se referem à concentração nominal da substância no início do teste, que causa toxicidade aguda a 50% dos organismos-teste, em determinado tempo de exposição (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008; ABNT, 2004; OGA et. al, 2008).

Em relação ao teste crônico, avaliam-se os efeitos subletais causados ao organismo-teste como os efeitos fisiológicos adversos na reprodução, crescimento, desenvolvimento de ovos, mutações, dentre outros. O período de exposição à substância é geralmente de 7 dias, abrangendo parte ou todo o ciclo de vida dos organismos. O resultado pode ser expresso principalmente em concentração de efeito não observado (CENO) e/ou concentração de efeito

observado (CEO) que se referem, respectivamente, à maior concentração nominal do agente químico que não causa efeitos deletérios ao organismo e à menor concentração nominal do agente químico que causa efeitos deletérios. Caso não sejam observados efeitos agudo ou crônico da substância, esta é considerada não tóxica (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008; ABNT, 2004; OGA et. al, 2008).

### **1.2.1. Efeitos Toxicológicos das Misturas de Substâncias**

A maioria dos estudos ecotoxicológicos baseiam-se no efeito de uma única substância química, assim como, é feito pela legislação vigente, Resolução Conama nº 357/2005, que estabelece padrões de qualidade da água para substâncias isoladas, podendo subestimar ou superestimar as concentrações necessárias para garantir a sobrevivência da biota aquática. Entretanto, sabe-se que no meio ambiente os organismos são expostos a diversas substâncias químicas, sendo fundamental o estudo da toxicidade de substâncias, principalmente, em mistura para avaliar e prever os efeitos toxicológicos nos organismos resultantes das interações de múltiplos contaminantes (NADDY et al., 2015).

Os modelos teóricos mais utilizados para descrever os efeitos toxicológicos da mistura de contaminantes são Adição de Concentração e Ação Independente que se baseiam no modo de ação de cada contaminante, utilizando o conhecimento da toxicidade dos contaminantes isolados e da interação entre os mesmos (PAVLAKI et al., 2011). O modelo de Adição de Concentração assume que todos os componentes da mistura possuem o mesmo modo de ação por interagir com a mesma molécula alvo (CEDERGREEN et al., 2008). Por outro lado, o modelo de Ação Independente presume que todos os componentes da mistura apresentam diferentes modos de ação, por ocorrer em diferentes sítios de ligação, porém apresentam os mesmos efeitos toxicológicos (BLISS, 1939).

Segundo Jonker et al. (2005), para cada modelo de ação, os efeitos tóxicos resultantes da mistura podem ser caracterizados pelos desvios sistemáticos de: sinergismo ou antagonismo, que referem-se à todas combinações de misturas que causam efeitos muito maiores (sinergismo) ou menores (antagonismo) em relação à soma dos efeitos a partir de constituintes isolados; dependente do nível da concentração, que caracteriza-se pelos efeitos causados em níveis de doses baixas serem diferentes dos efeitos em níveis de doses elevadas; dependente da razão da dose, que baseia-se no fato de que a composição da mistura interfere

nos efeitos causados, podendo identificar qual componente é o principal responsável pela toxicidade da mistura. Sendo assim, estes modelos podem ser utilizadas na predição dos riscos causados pelos efeitos da mistura de substância.

### 1.2.2. Organismo-teste

A escolha do organismo-teste é fundamental para a obtenção de resultados representativos. Os critérios básicos de avaliação para a seleção de um organismo-teste são: sensibilidade constante, elevada disponibilidade, representatividade em seu nível trófico, alta distribuição geográfica, estabilidade genética, fácil cultivo em laboratório e conhecimento das suas características genéticas e fisiológicas (RAND, 1995). Segundo Magalhães & Ferrão-Filho (2008), os principais organismos utilizados nos testes de toxicidade são microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas, oligoquetas e bactérias, que são pertencentes a diferentes níveis de organização biológica.

No presente trabalho foram utilizados como organismos-teste os microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* que são caracterizados por serem organismos planctônicos filtradores de água doce pertencentes à família Daphnidae e à ordem Cladocera. Estes organismos apresentam elevada taxa de distribuição e representatividade no seu nível trófico e exercem uma importante função da cadeia alimentar por serem consumidores primários e uma importante fonte de alimento para os peixes.

O crescimento dos cladóceras é por meio da ecdise, ocorrendo quase diariamente a depender da idade do organismo e a sua reprodução é partenogênica, quando em condições ambientais favoráveis (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). Os principais componentes fisiológicos dos cladóceras são 5 ou 6 pares de patas achatadas, que servem para capturar o alimento por filtração e 2 pares de antenas cefálicas, utilizadas para locomoção (ESTEVES, 1998).

A *Daphnia similis* (Figura 2) é uma espécie do gênero *Daphnia*, também conhecida como pulga d'água, apresentando comprimento máximo 3,5 mm. As espécies mais utilizadas na realização de teste de toxicidade no Brasil são a *Daphnia similis* e a *Daphnia magna*, que são espécies não nativas (ABNT, 2004). Apesar da *Daphnia similis* tem maior ocorrência em

águas do hemisfério norte, esta passou a ser utilizada como organismo-teste, devido a sua boa adaptabilidade em águas de baixa dureza (ARAGÃO et al., 2003).

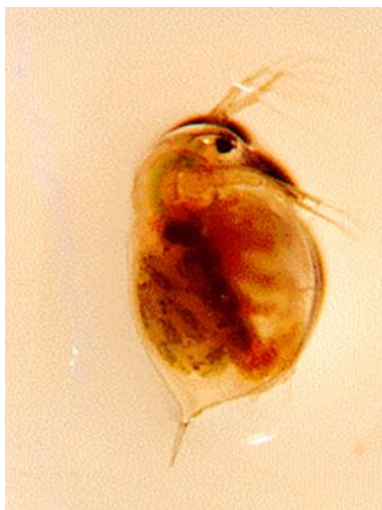


Figura 2 - Visão geral de uma fêmea de *Daphnia similis* (Aumento de 16x). Fonte: Beatrici, 2004.

A *Ceriodaphnia silvestrii* é uma espécie tropical nativa (MANSALO et al., 2013) que possui um corpo ovado e seu tamanho pode variar de 0,8 a 0,9 mm (ABNT, 2005b) (Figura 3). Esta espécie é também padronizada como organismo-teste pela ABNT (2005b) e em geral apresenta maior sensibilidade em relação às espécies de *Daphnia*.



Figura 3 - Visão geral de uma fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii* (Aumento de 100x). Fonte: Santos, 2004.

### 1.2.3. Teste de Sensibilidade

O teste de sensibilidade é uma importante prática para a avaliação da qualidade dos organismos-teste utilizados nos bioensaios, pois a variação da sensibilidade intrínseca do organismo pode influenciar na variabilidade dos resultados dos bioensaios (ZAGATTO &

BERTOLETTI, 2008). Segundo recomendações da ABNT, NBR12713/2004, os testes de sensibilidade devem ser realizados mensalmente, utilizando uma substância de referência, como cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), dodecil sulfato de sódio (DSS) e dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). A partir dos resultados dos testes de sensibilidade são calculados o valor médio, o desvio-padrão, os limites (superior e inferior) e o coeficiente de variação, utilizando os valores das CE50 ou CL50. A análise dos resultados é feita a partir da elaboração da carta-controle, que corresponde à representação gráfica da faixa de sensibilidade aceitável (média  $\pm$  2 desvios-padrão). Assim, os resultados de cada teste devem estar dentro da faixa de sensibilidade para comprovar que os organismos-teste estão aptos a serem utilizados, garantindo assim a confiabilidade dos bioensaios de toxicidade (ABNT, 2004).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Estudar os efeitos ecotoxicológicos de soluções em presença de metais-traço cobre e zinco, isoladamente e em mistura, através de bioensaios de toxicidade aguda com os organismos-teste *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Determinar a concentração efetiva média (CE50) do cobre e do zinco aos organismos-teste *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*;
- Verificar se as concentrações efetivas médias (CE50) dos metais se enquadram nos padrões estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005 para garantir a manutenção dos ecossistemas aquáticos em corpos de água doce de classe 2;
- Avaliação preliminar dos efeitos combinados dos metais-traço cobre e zinco aos organismos-teste *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Cultivo, Alimentação e Bioensaios de Toxicidade

Os exemplares iniciais para o cultivo de *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Raphidocelis subcapitata* foram obtidos no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia de Organismos Aquáticos do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), da Universidade de São Paulo (USP). O cultivo dos organismos-teste vem sendo realizado no Laboratório do Grupo de Estudos de Ecossistemas Aquáticos (GEEA), na Universidade Federal de Sergipe. A manutenção destes organismos seguem as recomendações descritas nas Normas ABNT, NBR 12713/2004 e 13373/2005, para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*, respectivamente.

A água utilizada tanto para a manutenção das culturas, quanto para a realização dos testes de toxicidade foi preparada com água mineral, tendo sido reconstituída por meio do ajuste da dureza (para 42 a 48 mg L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>), do pH (para 7,2 a 7,6) e da condutividade elétrica (próxima a 160 µS cm<sup>-1</sup>). Os organismos-teste foram cultivados em cristalizadores (Figura 4), com capacidade de 2,0 L e 50 indivíduos por lote para *Daphnia similis*, e 1,0 L e 70 indivíduos por lote para *Ceriodaphnia silvestrii*, sendo mantidos em sala climatizada com temperatura variando de 23 ± 2°C, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 1000 lux. As trocas da água de manutenção foram realizadas três vezes por semana, em dias alternados. A repicagem foi feita semanalmente, a partir de indivíduos com idade em torno de 24 horas, com a finalidade de se manter lotes de organismos com idades controladas.



Figura 4 - A figura ilustra as culturas de *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*, mantidas na sala de cultivo do Grupo de Estudos de Ecossistemas Aquáticos (GEEA), na Universidade Federal de Sergipe.

Fonte: Autor.

Os organismos-teste foram alimentados com a alga da espécie *Raphidocelis subcapitata*, em fase exponencial de crescimento, e com alimento composto produzido a partir de ração para peixe e de levedura.

O preparo da suspensão algal de *R. subcapitata* foi realizado em meio de cultura L.C. Oligo, seguindo os procedimentos descritos na ABNT, NBR 12648/2005. A inoculação da alga partiu de uma concentração de aproximadamente  $10^4$  células.mL<sup>-1</sup>, sendo as culturas mantidas em temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), iluminação e aeração constante por 7 dias. Após o processo de decantação em meio refrigerado, o sobrenadante foi descartado e a alga foi ressuspensa com a água de cultivo. O número de células das suspensões algais foi determinado através da contagem em microscópio óptico, utilizando uma câmara de Neubauer, sendo utilizadas as culturas que apresentaram densidade de  $5 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>.

Outro alimento utilizado foi o Vitormônio, preparado com levedura e ração para peixe. Para tanto, adicionou-se 5 g de ração de peixe triturada em 1000 mL de água destilada e mantido sob aeração constante por uma semana. Após a aeração e a sedimentação da solução, o sobrenadante foi filtrado em rede de plâncton de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  e o material sedimentado foi descartado. Posteriormente, distribuiu-se 50 mL da solução em recipientes plásticos atóxico, os quais foram armazenados em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento da sua utilização. A levedura foi preparada adicionando-se 0,25 g de fermento biológico seco em 50 mL de água destilada, sendo esta solução adicionada aos 50 mL de alimento constituído de ração de peixe armazenada. O alimento composto foi fornecido no momento das trocas das culturas na proporção de 1mL.L<sup>-1</sup> de água de cultivo, juntamente, com a suspensão algal durante a manutenção das culturas.

### 3.2. Teste de Sensibilidade

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade dos organismos-teste, ou seja, as condições fisiológicas dos mesmos foi realizado mensalmente testes de sensibilidade, utilizando uma substância de referência de acordo com as recomendações das Normas ABNT, NBR 12713/2004 e NBR 13373/2005. A substância de referência utilizada nos teste com *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* foi o cloreto de sódio (NaCl) da marca Neon. As soluções-teste para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* foram preparadas por diluições seriadas a partir da solução-estoque de 10 g.L<sup>-1</sup> de NaCl. Para a realização do teste de sensibilidade para



ambas espécies foram utilizados 5 neonatos (indivíduos com idade entre 6 a 24 horas), em 4 réplicas para cada concentração, expostos em 10 mL da solução-teste por um período de 48 horas, com temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), fotoperíodo de 12 horas, intensidade luminosa de 1000 lux e sem fornecimento de alimento aos organismos. Além disso, fez-se medições de pH, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e dureza no início e no final dos testes de sensibilidade. Ao término do ensaio fez-se a contagem do número de indivíduos imóveis para cada concentração-teste, sendo estes dados utilizados para o cálculo da CE50;48h com o auxílio do programa Trimmed Spearman Karber (HAMILTON et al., 1977). Posteriormente, elaborou-se uma carta-controle, ou seja, a faixa de sensibilidade de cada organismo-teste, constituída pelo valor médio, o desvio padrão e coeficiente de variação.

### 3.3. Bioensaios de Toxicidade

#### 3.3.1. Soluções-teste com Cobre

A solução-mãe foi preparada com 3,9292 g de sulfato de cobre II pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 + 5\text{H}_2\text{O}$ ) da marca Qhemis (P.A.), sendo diluída em 1000 mL de água destilada para a obtenção de uma concentração de  $1\text{g.L}^{-1}$  de cobre. A partir da solução estoque de  $0,1\text{mg.L}^{-1}$  de cobre, pôde-se preparar as soluções-teste para *Daphnia similis* e para *Ceriodaphnia silvestrii* nas concentrações descritas na Tabela 1 e Tabela 2 a seguir.

Tabela 1 - Apresentação das concentrações-teste utilizadas nos bioensaios de toxicidade aguda do cobre para *Daphnia similis*, expressos em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Concentração ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Solução- estoque (mL)	Água de Cultivo (mL)
1	1	99
5	5	95
9	9	81
13	13	87
17	17	83
21	21	79

Tabela 2 - Apresentação das concentrações-teste utilizadas nos bioensaios de toxicidade aguda do cobre para *Ceriodaphnia silvestrii*, expressos em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Concentração ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Solução- estoque (mL)	Água de Cultivo (mL)
1	1	99
3	3	97
5	5	95
7	7	93
9	9	91
11	11	89

### 3.3.2. Soluções-teste com Zinco

A solução-mãe foi preparada com 4,3981 g de sulfato de zinco heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ ) da marca Neon (P.A.), sendo diluída em 1000 mL de água destilada para a obtenção de uma concentração de  $1\text{g.L}^{-1}$  de zinco. A partir das soluções-estoques de  $1\text{mg.L}^{-1}$  e de  $10\text{mg.L}^{-1}$  de zinco, preparou-se as soluções-teste com água de cultivo para *Daphnia similis* e para *Ceriodaphnia silvestrii* nas concentrações descritas na Tabela 3 e na Tabela 4.

Tabela 3 - Apresentação das concentrações-teste utilizadas nos bioensaios de toxicidade aguda do zinco para *Daphnia similis*, expressos em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Concentração ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Solução- estoque (mL)	Água de Cultivo (mL)
10	1	99
20	2	98
40	4	96
80	8	92
160	1,6	98,4
320	3,2	96,8

Tabela 4 - Apresentação das concentrações-teste utilizadas nos bioensaios de toxicidade aguda do zinco para *Ceriodaphnia silvestrii*, expressos em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Concentração ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Solução- estoque (mL)	Água de Cultivo (mL)
5	0,5	99,5
10	1	99
20	2	98
40	4	96
80	8	92
160	1,6	98,4

Vale ressaltar que as concentrações 5, 10, 20, 40 e 80  $\mu\text{g.L}^{-1}$  foram preparadas a partir da solução-estoque 1  $\text{mg.L}^{-1}$  de zinco. Já as concentrações 160 e 320  $\mu\text{g.L}^{-1}$  foram preparadas a partir da solução-estoque 10  $\text{mg.L}^{-1}$  de zinco.

### 3.3.3. Estudos Preliminares da Mistura dos Metais-traço Cobre e Zinco

O delineamento experimental para a realização dos testes de toxicidade com a mistura de cobre e zinco foi baseado na soma das concentrações utilizadas de forma isolada nos testes de toxicidade aguda. Assim, foi utilizado um desenho fatorial com 6 x 6 tratamentos, com cinco réplicas cada tratamento, obtendo-se as concentrações-teste da mistura para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* (Tabela 5 e Tabela 6, respectivamente). A concentração mais alta deve resultar preferencialmente em 100% de mortalidade e, a mais baixa, deve fornecer efeito não observado.

Tabela 5 - Apresentação das concentrações-teste utilizadas nos bioensaios de toxicidade da mistura dos metais-traço cobre e zinco para *Daphnia similis*.

Concentração de Cu + Zn ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
1 + 10
5 + 20
9 + 40
13 + 80
17 + 160

Tabela 6 - Apresentação das concentrações-teste utilizadas nos bioensaios de toxicidade da mistura dos metais-traço cobre e zinco para *Ceriodaphnia silvestrii*.

Concentração de Cu + Zn ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
1 + 5
3 + 10
5 + 20
7 + 40
9 + 80

Após a realização do teste de toxicidade aguda da mistura com cobre e zinco, os resultados isolados e em mistura foram lançados na planilha ToxCalcMix. A partir desse programa os dados foram modelados tendo em vista os modelos conceituais de Adição da Concentração e Ação Independente. Após esta modelação foi igualmente verificado qual desvio de inibição que melhor descreve a toxicidade da mistura (sinergismo ou antagonismo, dependente do nível da dose ou dependente da dose).

### 3.4. Bioensaios de Toxicidade Aguda

Foram realizados bioensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* expostas ao cobre e ao zinco, individualmente, e em mistura, seguindo os procedimentos descritos nas Normas ABNT, NBR 12713/2004.

Os bioensaios com *Ceriodaphnia silvestrii* e *Daphnia similis* foram montados utilizando-se 5 neonatos (indivíduos com idade entre 6 a 24 horas), expostos em 10 mL de cada solução-teste, em 5 réplicas, introduzidos em copos plásticos atóxico. Os bioensaios tiveram uma duração de 48 horas, com temperatura controlada variando entre  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas, intensidade luminosa de 1000 lux e sem fornecimento de alimento aos organismos. Ao término do ensaio, fez-se a contagem dos indivíduos imóveis e posterior análise estatística, sendo os resultados expressos em CE50;48h. Ao todo foram realizados para cada organismo-teste 2 bioensaios de toxidade aguda com cobre e zinco, separadamente, e um teste preliminar com a mistura destes metais. No início e final dos bioensaios, também foram efetuadas medidas de pH, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e dureza da água testada.

### 3.5. Tratamento Estatístico

Os resultados dos testes de toxicidade aguda com as substâncias de referência e com os metais-traço foram calculados através do método estatístico Trimmed Spearman-Kärber e expressos em CE50;48h (HAMILTON et al., 1977). Quanto a elaboração da carta-controle da substância de referência, utilizou-se o programa Excel para o cálculo da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação, considerando os valores das CE50;48h de cada teste de sensibilidade previamente realizado.

A avaliação dos resultados dos bioensaios de toxicidade aguda com o cobre e zinco, isolados e em mistura, foram feitas através da planilha ToxCalcMix, utilizando o software Microsoft Excel, desenvolvido pelo professor Dr. António Nogueira (membro do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, em Portugal) com o objetivo de avaliar o efeito toxicológico da mistura de substâncias químicas através da identificação do modelo de ação e de seu respectivo desvio que melhor represente a toxicidade da mistura.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Teste de Sensibilidade

A faixa de sensibilidade para *Daphnia similis* ao cloreto de sódio (Figura 5) foi calculada considerando os resultados dos testes realizados no período de maio a outubro de 2015, sendo apresentados os valores de CE50;48h e os seus intervalos de confiança no Apêndice A (Tabela A1). A faixa de sensibilidade para *Daphnia similis* ao cloreto de sódio variou entre 1,50 e 2,60 g.L<sup>-1</sup>, com valor médio de CE50 de 2,05 g.L<sup>-1</sup> e coeficiente de variação (CV) de 13,43 %.

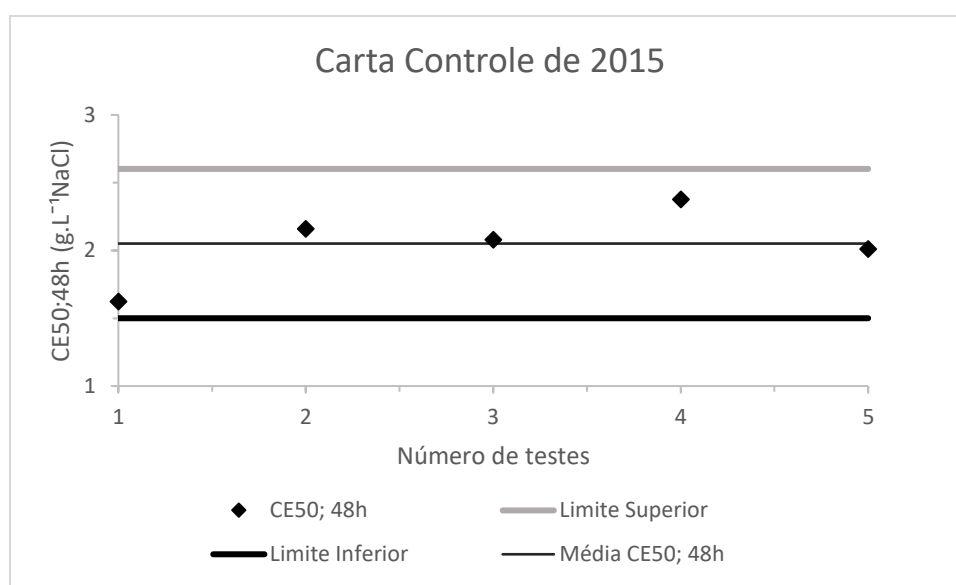


Figura 5 - Resultados dos testes de sensibilidade para *Daphnia similis* ao cloreto de sódio como substância de referência, expressos em g.L<sup>-1</sup> (Carta Controle de 2015).

Já para a *Ceriodaphnia silvestrii*, o cálculo da faixa de sensibilidade ao cloreto de sódio foi baseada nos testes de sensibilidade realizados nos meses de maio a setembro de 2015. A faixa de sensibilidade para *Ceriodaphnia silvestrii* ao cloreto de sódio situa-se entre 0,95 a 1,55 g.L<sup>-1</sup> (Figura 6), com valor médio da CE50;48h de 1,25 g.L<sup>-1</sup> e CV de 11,90 %, demonstrados no Apêndice A (Tabela A2).

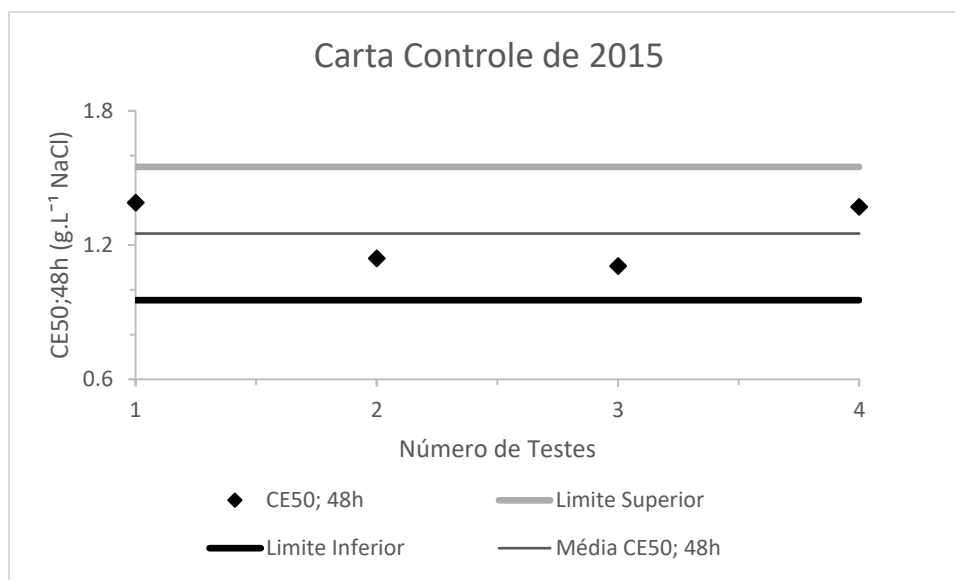


Figura 6 - Resultados dos testes de sensibilidade para *Ceriodaphnia silvestrii* ao cloreto de sódio como substância de referência, expressos em g.L<sup>-1</sup> (Carta Controle de 2015).

Para ambos os organismos-teste, evidenciou-se que os resultados dos mesmos encontram-se dentro das respectivas faixas de sensibilidade, além destes valores estarem próximos aos valores de CE50;48h determinados por outros autores em condições semelhantes, demonstrados na Tabela 7. Sendo assim, os organismos-teste estavam aptos para serem utilizados nos bioensaios de toxicidade aguda, proporcionando resultados confiáveis.

Tabela 7 - Valores das CE50;48h (g.L<sup>-1</sup> NaCl) dos testes de sensibilidade para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* ao cloreto de sódio obtidos por diversos autores, apresentando seus respectivos valores de pH e de dureza utilizados durante os testes.

Espécie	pH	Dureza (mg.L <sup>-1</sup> de CaCO <sub>3</sub> )	CE50;48h (g.L <sup>-1</sup> )	Autores
<i>D. similis</i>	7,2 - 7,6	42 - 48	2,05	Presente estudo
	7,2 - 7,6	40 - 48	1,38	Nogueira (2010)
	7,0	40 - 48	2,03	Lameira (2008)
	7,2 - 7,6	40 - 48	2,68	Barbosa et al. (2012)
<i>C. silvestrii</i>	7,2 - 7,6	42 - 48	1,25	Presente estudo
	7,0 - 7,6	40 - 48	1,20	Araujo (2013)
	7,2 - 7,6	40 - 48	1,65	Rosa (2008)
	7,2 - 7,6	40 - 48	1,74	Inafuku (2011)

## 4.2. Bioensaios de Toxicidade Aguda

### 4.2.1. Sensibilidade dos Organismos-teste ao Cobre

A faixa de sensibilidade dos testes de toxicidade aguda para *Daphnia similis* ao cobre foi de 12,11 a 12,70  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 7), sendo a média da CE50;48h de 12,41  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e CV de 1,20 %, com desvio padrão de 0,15  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Os resultados obtidos nestes testes estão apresentados na Tabela 8 e no Apêndice B (Tabelas B1 e B2)

Tabela 8 - Apresentação dos valores de CE50;48h e de seus respectivos intervalos de confiança referentes aos testes de toxicidade aguda ao cobre para *Daphnia similis*.

Teste n <sup>o</sup>	CE50;48h ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Intervalo de Confiança (95%)
1	12,51	10,53 – 14,86
2	12,30	10,45 – 14,49

**Média:** 12,41  $\mu\text{g.L}^{-1}$   
**Faixa de Sensibilidade:** 12,11 – 12,70  $\mu\text{g.L}^{-1}$   
**Desvio Padrão:** 0,15  $\mu\text{g.L}^{-1}$   
**Coefficiente de Variação:** 1,20 %

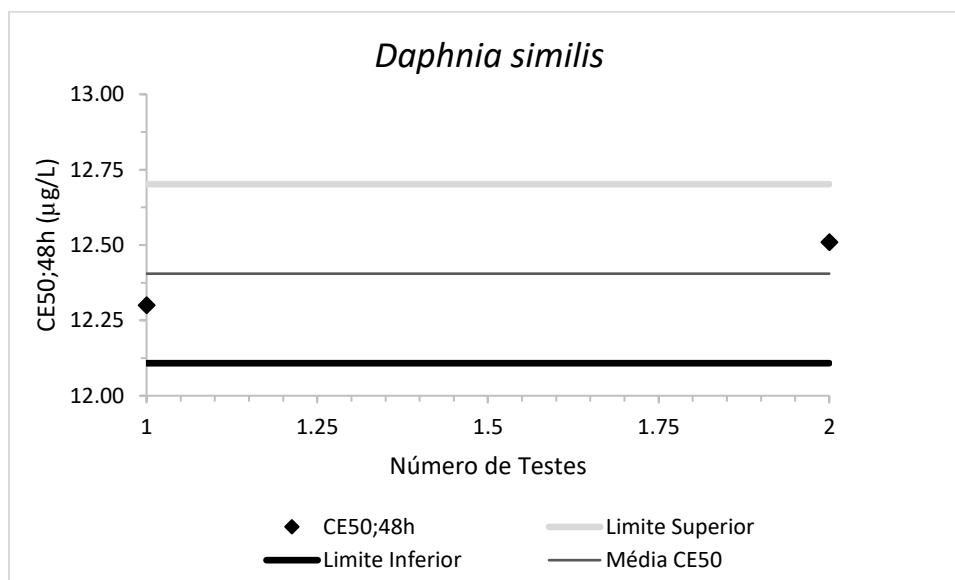


Figura 7 - Resultados dos testes de toxicidade aguda para *Daphnia similis* ao cobre, expressos em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Em relação aos resultados dos testes de toxicidade aguda para *Ceriodaphnia silvestrii*, a média da CE50;48h foi de 8,79  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , com variação entre 7,86 a 9,72  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e CV de 5,31% (Figura 8), sendo os resultados obtidos nos testes descritos da Tabela 9 e no Apêndice B (Tabelas B3 e B4).



Tabela 9 - Apresentação dos valores de CE50;48h e de seus respectivos intervalos de confiança referentes aos testes de toxicidade aguda ao cobre para *Ceriodaphnia silvestrii*.

Teste nº	CE50;48h ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Intervalo de Confiança (95%)
1	8,46	7,98 - 8,98
2	9,12	8,66 - 9,61

**Média:** 8,79  $\mu\text{g.L}^{-1}$   
**Faixa de Sensibilidade:** 7,86 - 9,72  $\mu\text{g.L}^{-1}$   
**Desvio Padrão:** 0,47  $\mu\text{g.L}^{-1}$   
**Coefficiente de Variação:** 5,31 %

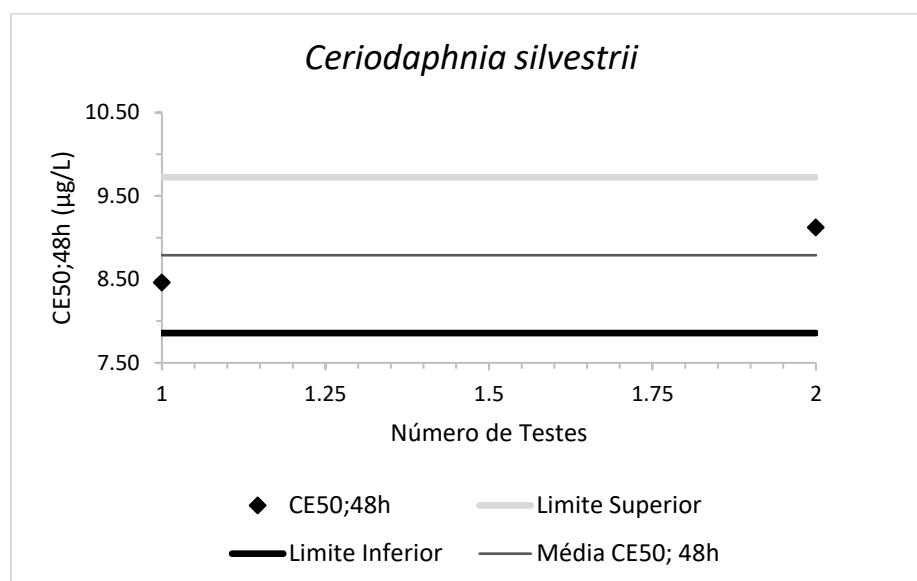


Figura 8 - Resultados dos testes de toxicidade aguda de *Ceriodaphnia silvestrii* ao cobre, expressos em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

A média da CE50;48h determinada para *Daphnia similis* encontra-se na mesma ordem de grandeza quando comparada aos valores de 10,0 e 10,6  $\mu\text{g.L}^{-1}$  obtidos, respectivamente, por Masutti (2004) e Tavares et al. (2014) para a mesma espécie e com os mesmos ajustes de pH, dureza e temperatura. Entretanto, Novelli (2005) obteve uma média de CE50;48h igual a 4,2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para *D. similis*, utilizando condições de testes semelhantes (de pH, dureza e fotoperíodo). Assim, *D. similis* no presente estudo, mostrou-se cerca de 3 vezes mais resistente ao cobre (Tabela 10). Já os valores médios da CE50;48h obtidos por Arauco et al. (2005) para *D. similis* (42,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), *D. magna* (45,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e *D. laevis* (170,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) foram superiores em relação aos valores obtidos no presente estudo, possivelmente, devido ao uso de diferentes ajustes na temperatura ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e pela execução dos testes em ambiente escuro. Segundo Zagatto & Bertoletti (2008), a temperatura pode influenciar no metabolismo dos organismos e na solubilidade de determinadas substâncias. Assim, o ajuste de temperatura

( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) utilizado no presente estudo pode ter contribuído para o aumento da solubilidade do cobre e consequente aumento da toxicidade do mesmo devido aos íons livres de cobre estarem mais biodisponíveis nessa temperatura.

Outro fator que contribui para a diminuição da toxicidade de metais é a presença de matéria orgânica, como foi demonstrado por Meyer et al. (2015) que obteve uma média CE50;48h de  $103,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  com a adição de  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  de carbono orgânico dissolvido nas soluções-teste. Apesar das condições de pH e dureza serem pouco distintas, a presença de matéria orgânica foi o fator primordial para a diminuição da toxicidade por adsorver os íons cobre livres, diminuindo a biodisponibilidade do cobre. A adição da mistura de alimento e argila nas soluções-teste contribuiu para a redução da toxicidade de metais-traços, como foi observado nos estudos de Jeon et al. (2010). A média da CE50;48h obtida para *D. magna* pelo autor foi muito superior à concentração no presente estudo, pois a argila é considerada como um dos principais adsorventes do cobre.

Quanto aos resultados dos bioensaios de toxicidade aguda para *C. silvestrii*, observou-se que *C. silvestrii* foi mais sensível em relação a *D. similis*, podendo ser justificado pelas espécies do gênero *Ceriodaphnia* ser geralmente mais sensível em relação à *D. similis* (LOPES et al., 2009). Além disso, segundo VERSTEEG et al. (1997), a diferença entre as médias CE50;48h obtidas nos testes de toxicidade aguda entre as espécies de cladóceros é pequena, o que indica que há uma similaridade de sensibilidade entre diferentes espécies, quando os valores das médias da CE50;48h das duas espécies apresentarem um fator máximo de diferença igual a 8, como pode ser observado nos resultados obtidos no presente estudo.

Para semelhantes condições de dureza e de pH dos teste de toxicidade aguda, foi possível observar que o presente estudo apresentou uma concentração similar a CE50;48h obtida por Masutti (2004) para a mesma espécie. Entretanto, a *C. silvestrii* foi mais resistente em relação à *C. dubia* no trabalho desenvolvido por Novelli (2005). Além disso, quando comparado a CE50;48h calculada por Naddy et al. (2015), a *C. silvestri* mostrou-se ser mais sensível do que *C. dubia*, como é demonstrado na Tabela 10. A heterogeneidade destes resultados pode ser decorrente da variabilidade da sensibilidade das espécies e/ou das condições físico-químicas durante o ensaio.

De acordo com Hyne et al. (2005), a CE50;48h média para *C. dubia* foi de  $7,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ , sendo adicionados  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de carbono orgânico dissolvido. Portanto, a presença de matéria orgânica contribuiu para a diminuição da concentração de íons de cobre livres e,

consequentemente, casou a redução da toxicidade do cobre. Além disso, o mesmo autor constatou que a toxicidade do cobre também aumentou com a diminuição do pH.

Para diferentes condições de pH e de dureza, a CE50;48h média para *C. dubia* calculada por Cooper et al. (2009) foi uma ordem de grandeza superior à concentração para *C. silvestrii* no presente trabalho. Neste caso, a dureza foi o fator que mais influenciou na diminuição da sensibilidade da toxicidade ao cobre.

Além disso, avaliando-se os padrões de qualidade da água estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005 para corpos d'água de classe 2, observou-se que a média da CE50;48h para *D. similis* ( $12,41 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) foi superior a concentração de cobre dissolvido ( $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) estabelecida por esta resolução. Entretanto, a CE50;48h para *C. silvestrii* foi inferior a essa concentração ( $8,79 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Portanto, o limite máximo permitido de cobre por tal resolução pode apresentar-se de modo inadequado para garantir a sobrevivência de organismos mais sensíveis frente à exposição isolada do mesmo. Vale ressaltar que a influência das variações das condições físico-químicas do meio aquático como pH, dureza, temperatura e concentração de matéria orgânica sob a toxicidade do metal-traço não são levadas em consideração na referente resolução para o estabelecimento de concentrações mais efetivas e garantir a preservação dos ecossistemas aquáticos.

Tabela 10 - Valores das CE50;48h ( $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cu) dos testes de toxicidade aguda para *Daphnia sp.* e *Ceriodaphnia sp.* ao cobre obtidos por diversos autores, apresentando seus respectivos valores de pH e de dureza utilizados durante os testes.

Espécie	pH	Dureza ( $\text{mg.L}^{-1}$ de $\text{CaCO}_3$ )	CE50;48h médio ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Autores
<i>D. similis</i>	7,2 - 7,6	42 - 48	12,4	Presente estudo
	7,2 - 7,6	42 - 48	4,2	Novelli (2005)
	7,2 - 7,6	42 - 48	10,0	Masutti (2004)
	7,2 - 7,6	40 - 48	10,6	Tavares et al. (2014)
	7,6	45	42,0	Arauco et al. (2005)
<i>D. magna</i>	7,6	45	45,0	Arauco et al. (2005)
	7,4 - 7,8	80 - 100	103,0	Meyer et al. (2015)*
	7,6 - 8,0	105 - 115	333,8	Jeon et al. (2010) **
<i>D. laevis</i>	7,6	45	170,0	Arauco et al. (2005)
<i>C. silvestrii</i>	7,2 - 7,6	42 - 48	8,8	Presente estudo
	7,2 - 7,6	42 - 48	9,5	Masutti (2004)
<i>C. dubia</i>	7,2 - 7,6	42 - 48	2,8	Novelli (2005)
	6,5	44	7,3	Hyne et al. (2005)
	7,2 - 7,8	80 - 100	18,0	Cooper et al. (2009)
	7,1 - 7,9	40	16,6	Naddy et al. (2015)

\* Utilização de 3  $\text{mg.L}^{-1}$  de carbono orgânico dissolvido nas soluções-teste; \*\* Com alimentação.

#### 4.2.2. Sensibilidade dos Organismos-teste ao Zinco

Os valores das CE50;48h calculadas para os dois testes de toxicidade aguda com zinco para *D. similis* variaram entre 20,86 e 49,14  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 9), sendo o valor médio igual a 35,00  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , com desvio padrão 7,07  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e CV de 20,20 %. Os resultados obtidos nos bioensaios com zinco estão apresentados na Tabela 11 e no Apêndice B (Tabelas B5 e B6).

Tabela 11 - Apresentação dos valores de CE50;48h ( $\mu\text{g.L}^{-1}$  Zn) e de seus respectivos intervalos de confiança referentes aos testes de toxicidade aguda com zinco para *Daphnia similis*.

Teste n°	CE50;48h ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Intervalo de Confiança (95%)
1	30	20 - 40
2	40	30 - 60
<b>Média:</b> 35,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$		
<b>Faixa de Sensibilidade:</b> 20,86 - 49,14 $\mu\text{g.L}^{-1}$		
<b>Desvio Padrão:</b> 7,07 $\mu\text{g.L}^{-1}$		
<b>Coefficiente de Variação:</b> 20,20 %		

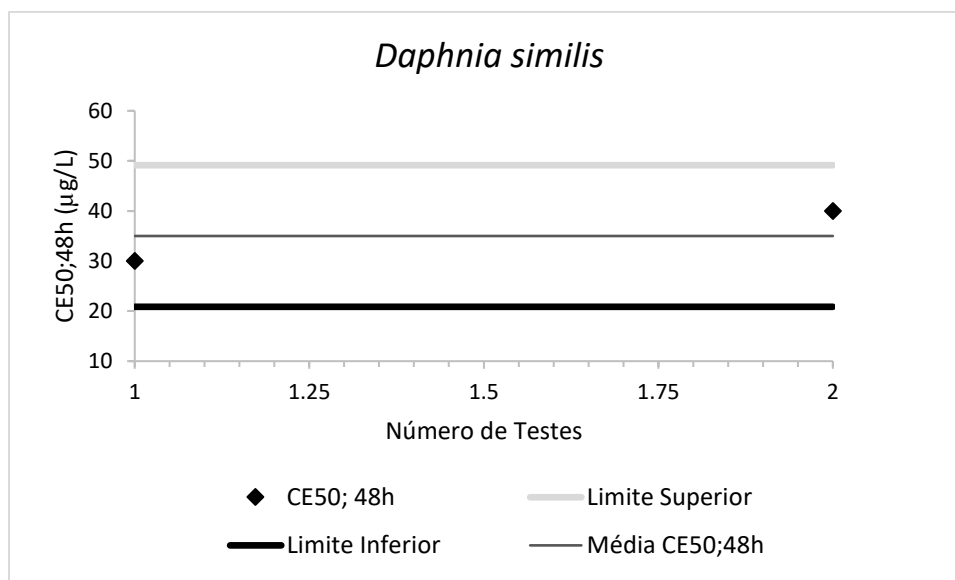


Figura 9 - Resultados dos testes de toxicidade aguda para *Daphnia similis* ao zinco, expressos em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Para os testes de toxicidade com *C. silvestrii*, os valores de CE50;48h variaram de 30,86 a 59,14  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , sendo a média CE50;48h de 45,00  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e CV de 15,71 % (Figura 10). Os resultados dos testes de sensibilidade da *C. silvestrii* ao zinco estão apresentados na Tabela 12 e no Apêndice B (Tabelas B7 e B8).

Tabela 12 - Apresentação do valores de CE50;48h ( $\mu\text{g.L}^{-1}$  Zn) e de seus respectivos intervalos de confiança referentes aos testes de toxicidade aguda com zinco para *Ceriodaphnia silvestrii*.

Teste n <sup>o</sup>	CE50;48h ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Intervalo de Confiança (95%)
1	50	40 - 60
2	40	30 - 60
<b>Média:</b> 45,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$		
<b>Faixa de Sensibilidade:</b> 30,86 – 59,14 $\mu\text{g.L}^{-1}$		
<b>Desvio Padrão:</b> 7,07 $\mu\text{g.L}^{-1}$		
<b>Coefficiente de Variação:</b> 15,71 %		

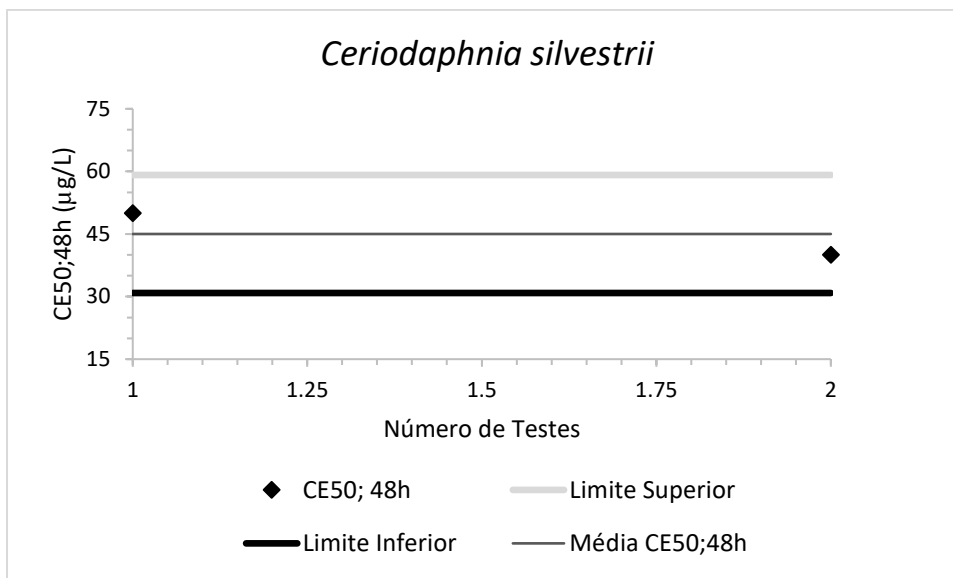


Figura 10 - Resultados dos testes de toxicidade aguda de *Ceriodaphnia silvestrii* ao zinco, expressos em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Nos estudos realizados por Yim et al. (2006) com *D. magna*, o valor médio da CE50;48h para o zinco foi de  $30,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ , sendo próximo ao valor obtido no presente estudo. Entretanto, o valor médio de CE50;48h calculado por Cooper et al. (2009) foi muito superior em relação ao presente estudo, devido à elevada dureza da água cultivo utilizada nos testes com *D. carinata*. Além da influência da dureza, Meyer et al. (2015) observou que a presença de matéria orgânica influencia na diminuição da toxicidade do zinco para *D. magna*, apresentando uma CE50;48h de  $696,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  devido a adição de  $3\text{mg.L}^{-1}$  carbono orgânico dissolvido.

Comparando-se os valores médios de CE50;48h dos organismos-teste utilizados nos teste de toxicidade aguda com zinco, foi possível constatar que a *C. silvestrii* e *D. similis* apresentaram sensibilidade similares. Entretanto, de acordo com Wen-Xiong (2013) e Shaw et al. (2006), geralmente, as espécies de dafnídeos são mais tolerantes a exposição ao zinco, possivelmente, devido aos processos de aclimação das mesmas ao zinco ou de processos de desintoxicação (homeostase).

A média de CE50;48h para *C. silvestrii* no presente estudo, mostrou-se mais sensível em comparação com os valores obtidos por outros autores, os quais são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores de CE50;48h ( $\mu\text{g.L}^{-1}$  Zn) dos testes de toxicidade aguda para *Daphnia sp.* e *Ceriodaphnia sp.* ao zinco obtidos por diversos autores, apresentando seus respectivos valores de pH e de dureza utilizados durante os testes.

Espécie	pH	Dureza ( $\text{mg.L}^{-1}$ de $\text{CaCO}_3$ )	CE50;48h médio ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Autores
<i>D. similis</i>	7,2 - 7,6	42 - 48	35,0	Presente estudo
<i>D. magna</i>	7,6 - 8,0	40 - 48	30,0	Yim et al. (2006)
	7,4 - 7,8	80 - 100	696,0	Meyer et al. (2015)*
<i>D. carinata</i>	7,2 - 7,8	80 - 100	339,8	Cooper et al. (2009)
<i>C. silvestrii</i>	7,2 - 7,6	42 - 48	45,0	Presente estudo
<i>C. dubia</i>	7,5	44	155,0	Hyne et al. (2005)
	7,2 - 7,8	80 - 100	173,5	Cooper et al. (2009)
	7,1 - 7,9	40	61,8	Naddy et al. (2015)

\* Utilização de 3  $\text{mg.L}^{-1}$  de carbono orgânico dissolvido nas soluções-teste.

Segundo a Resolução CONAMA nº 357/2005, a concentração total de zinco permitida para rios de classe 2 é de 180  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , sendo uma concentração superior aos valores médios da CE50;48h para *D. similis* (35,00  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e *C. silvestrii* (45,00  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Portanto, a concentração limite padrão da resolução pode ser inadequada para a manutenção dos organismos em estudo, considerando a exposição a concentrações isoladas de zinco, além da resolução não considerar a influência das possíveis variações físico-químicas no meio aquático sobre a toxicidade do metal-traço.

#### 4.2.3. Sensibilidade dos Organismos-teste à Mistura dos Metais-traço Cobre e Zinco

Os resultados encontrados através dos cálculos realizados pelo programa ToxCalcMix, referentes aos testes preliminares da mistura, possibilitou prever que o modelo de ação que melhor descreveu a interação dos metais-traço na mistura foi o modelo de Ação Independente. Este modelo caracteriza-se pelos componentes da mistura apresentarem um modo de ação dissimilar, ou seja, os metais-traço interagem com diferentes sítios de ligação, mas causam efeitos toxicológicos similares. O desvio de inibição para este modelo foi o dependente do nível da dose, sendo antagonismo em baixas doses e sinergismos em doses elevadas. Com base nesses dados, verificou-se que tanto o cobre e quanto o zinco são mais tóxicos quando em mistura, em comparação com os efeitos isolados de CE50;48h, como demonstrado da Tabela 14 (Apêndice B – Tabelas B9 e B10).

Tabela 14 - Resultados da análise dos testes de toxicidade aguda da mistura binária de cobre e zinco para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*, utilizando os conceitos de modelos de ação (Adição de Concentração e Ação Independente).

Teste	Organismo-teste	Cobre ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) CE50;48h	Zinco ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) CE50;48h	Modelo de Ação*	Desvios de Inibição**
Isolado	<i>Daphnia similis</i>	12,4	35,0	-	-
	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	8,8	45,0		
Mistura	<i>Daphnia similis</i>	-	-	Ação Independente	Antagonismo em baixas doses e sinergismos em altas doses
	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	-	-		

\*Modelo de ação que melhor descreve o modo de interação de cada componente da mistura com as moléculas-alvo/sítios de ligação;

\*\*Desvios de inibição dos modelos de ação que melhor descreve os efeitos da toxicidade da mistura.

Vale ressaltar que é necessária a realização de testes adicionais com novas misturas binárias de soluções, através da permutação das concentrações utilizadas nos bioensaios de toxicidade aguda com o cobre e o zinco, isoladamente, com o objetivo de obter um melhor entendimento e detalhamento dos efeitos toxicológicos causados pela mistura dos metais em estudo.

O desvio de inibição obtido no presente estudo foi observado também por Jonker et al. (2005), que avaliaram os efeitos da adição do cobre, zinco, cádmio e chumbo no solo sobre o aumento do peso corporal do *Folsomia candida*. Sendo assim, o desvio de inibição que melhor descreve a toxicidade da mistura foi o dependente do nível da dose para o modelo de Adição de Concentração, indicando antagonismo em baixas doses e sinergismos em doses elevadas. Um outro estudo desenvolvido por Van Gestel & Hensbergen (1997), considerando o modelo de Adição de Concentração, avaliaram o efeito da mistura de cádmio e zinco na reprodução *Folsomia candida*, apresentando os mesmos efeitos obtidos no presente estudo, sendo o antagonismo em baixas doses e o sinergismos causados, respectivamente, pelo cádmio e pelo zinco.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo e dispostos na literatura, reafirma-se a importância do desenvolvimento de estudos ecotoxicológicos sobre os efeitos combinados entre agentes tóxicos para prever o real risco ambiental de contaminantes em ecossistemas aquáticos, visto que os organismos não estão expostos a uma única substância e



o ambiente aquático é dinâmico, e sofre constantes modificações em sua composição físico-química. A exemplo de Barata et al. (2006), que avaliaram os efeitos isolados e em mistura de inseticidas piretróides e de metais (cádmio e cobre), e Cooper et al. (2009), que realizaram testes de toxicidade aguda e crônica para determinar os efeitos das misturas de cobre, chumbo e zinco para *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia carinata*. Sendo assim, os limites estabelecidos pela legislação vigente para contaminantes orgânicos e inorgânicos isolados, em geral, podem apresentar-se inadequados para garantir a manutenção da biota aquática.

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda para os metais-traços cobre e zinco, pode-se concluir que:

- Os valores da CE50;48h referentes aos testes de toxicidade aguda ao cobre para *Daphnia similis* foi de 12,4  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e para *Ceriodaphnia silvestrii* foi de 8,8  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Portanto, o limite estabelecido pela Resolução CONAMA n<sup>o</sup> 357/2005 para cobre dissolvido (9  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) para corpos d'água de classe 2, foi superior apenas em relação a CE50;48h obtida para *Ceriodaphnia silvestrii*, o que demonstra um possível comprometimento da biota aquática, quando expostas o efeito isolado do cobre;
- Os valores da CE50;48h referentes aos testes de toxicidade aguda ao zinco foram inferiores tanto para *Daphnia similis* (35,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), quanto para a *Ceriodaphnia silvestrii* (45,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) em relação ao limite estabelecido pela Resolução CONAMA n<sup>o</sup> 357/2005 para zinco total (180  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) para corpos d'água de classe 2, o que demonstra que os padrões de qualidade da água para rios da classe 2 podem estar inadequados para garantir a sobrevivência dos organismos aquáticos ao serem expostos isoladamente ao zinco;
- A partir das análises feitas utilizando a planilha ToxCalcMix, identificou-se que o modelo de Ação Independente permitiu uma melhor descrição da interação dos metais-traço na mistura, sendo a toxicidade da mistura dependente do nível da dose, indicando antagonismo em baixas doses e sinergismos em doses elevadas;
- Diante dos resultados encontrados no presente trabalho, é evidente a necessidade da discussão acerca dos limites determinados pela atual Resolução CONAMA n<sup>o</sup> 357/2005, uma vez que os metais são elementos conservativos que podem bioacumular e biomagnificar em cadeia trófica, além dos efeitos combinados de metais e da influência das propriedades físico-químicas do ambiente aquático não serem previstos na referida resolução.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). **Toxicological Profile for Zinc**. U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, 2005.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). **Toxicological Profile for Copper**. U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Atlanta, 2004.

ARAGÃO, M.A.; BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E. Total hardness of surface waters in São Paulo State (Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensia**. v. 15, n. 1, p. 15-18, 2003.

ARAUCO, L. R. R.; CRUZ, C.; MACHADO-NETO, J. G. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia*. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 15, p. 55-64, jan./dez. 2005.

ARAUJO, K. C. M. **Otimização e aplicação de metodologia analítica utilizando CLAE/FL para monitoramento de fármacos antibacterianos fluoroquinolônicos em águas do rio Anil localizado na cidade de São Luís/MA**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnica). **NBR 12713**: ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com *Daphnia sp.* (Crutacea, Cladocera). 2 ed. 21 p., 2004.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnica). **NBR 12648**: ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica: método de ensaio com algas (Chlorophyceae). 2 ed. 24 p., 2005a.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnica). **NBR 13373**: ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica: método de ensaio com *Ceriodaphnia ssp* (Crutacea, Cladocera). 2 ed. 15 p., 2005b.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. Ed. Atheneu, 554 p., 2003.

BALIARSINGH, S. K. et al. Accumulation of heavy metals by freshwater zooplankton: a toxicological study. In: **Recent advances in space technology services and climate change (RSTSCC)**, 2010, Chennai, 2010, p. 7-14.

BARATA, C.; BAIRD, D. J.; SOARES, A. M. V. M. Demographic responses of a tropical cladoceran to cadmium: effects of food supply and density. **Ecological Applications**, v. 12, p. 552-564, 2002.

BARATA, C. et al. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 1-14, 2006.

BARBOSA, I. M.; MANIERO, M. G.; GUIMARÃES, J. R. **Avaliação da toxicidade aguda de abamectina para *Daphnia similis***. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE

ECOTOXICOLOGIA, 25, 2012. Porto de Galinhas: Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (SBE), 2012, 268 p.

BARROSO, M. F. S. **Efeitos ecotoxicológicos de pesticidas e factores abióticos em *Daphnia magna***. 53 f. Dissertação (Mestrado em Contaminação e Toxicologia Ambientais) - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, 2009.

BEATRICI, A. C. **Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* (Crustácea, Cladocera) submetidas a diferentes tipos de dietas e meios de cultivos**. 2004. 38 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

BJERREGAARD, P.; ANDERSEN, C. B. I.; ANDERSEN, O. A. Ecotoxicology of metals: sources, transport, and effects in the ecosystem. In: Nordberg, F. N., Fowler, B. A., Nordberg, M. (Edition). **Handbook on the toxicology of metals**. 4. ed. Burlington: Academic Press, v. 1, 2015. p. 425-460.

BLISS, C. I. The toxicity of poisons applied jointly. **Annals of applied biology**. v. 26, p. 585-615, 1939.

BONA, M. D.; LEVA, V. D.; LIGUORO, M. The sensitivity of *Daphnia magna* and *Daphnia curvirostris* to 10 veterinary antibacterials and to some of their binary mixtures. **Chemosphere**, v.115, p. 67-74, 2014.

BUSS, D. F.; OLIVEIRA, R. B.; BATISTA, D. F. Monitoramento Biológico de Ecossistemas Aquáticos Continentais. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 339-345, 2008.

CEDERGREEN, N. et al. A Review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1621–1632, 2008.

COOPER, N. L.; BIDWEL, J. R.; KUMAR, A. Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 72, p. 1523–1528, 2009.

COSTA, C. R.; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

EPA (Environmental Protection Agency). **Toxicological review of zinc and compounds**. Washington D.C., 2005.

EPA (Environmental Protection Agency). **Aquatic life ambient freshwater quality criteria: copper**. Washington. 2007. 204 p. Disponível em:  
<<http://www.epa.gov/waterscience/criteria/aqlife.html>>. Acesso em: 05 set. 2015, 16:10.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 602 p., 1998.

ESTEVES, F. A.; GUARIENTO, R. D. Elementos-traço. In: ESTEVES, F. A. (Org.). **Fundamentos de limnologia**. São Paulo: Interciência. 3 ed. 826 p., 2011.

GAUTAM, R. K.; et al. In: SHARMA, Sanjay. **Heavy metals in water: presence, removal and safety**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 380 p., 2014.

GUILHERME, L. R. G. et al. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 4, p. 345-390, 2005.

HAMILTON, M.; RUSSO, R. C.; TRURSTON, R. V. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, p. 714-719, jun. 1977.

HARICHANDAN, R.; ROUTROY, S.; MOHANTY, J. K.; Panda, C. R. An assessment of heavy metal contamination in soils of fresh water aquifer system and evaluation of ecotoxicity by lithogenic implications. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 3503–3516, 2013.

HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BUTON, G. A. Jr.; CAIRNS J. Jr. **Introduction. Handbook of Ecotoxicology**. 2. ed. Chelsea: Lewis Publishing, 2002.

HYNE, R. V. et. al. Influence of water chemistry on the acute toxicity of copper and zinc to the Cladoceran *Ceriodaphnia Cf dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 1667-1675, 2005.

INAFUKU, M. M. **Avaliação da qualidade da água do rio Corumbataí com *Ceriodaphnia silvestrii* e determinação de Metais Pesados em sedimentos em suspensão**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Química na Agricultura) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

JEON, J. et al. Role of food and clay particles in toxicity of copper and diazinon using *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 400–406, 2010.

JO, H. et. al. Combined effects of water quality parameters on mixture toxicity of copper and chromium toward *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 81, p. 1301–1307, 2010.

JONKER, M.J. et al. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, p. 2701-2713, abr. 2005.

LAMEIRA, V. **Estudos letais e subletais (reprodução e teratogênese) do fármaco triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia silvestrii* (CLADOCERA, CRUSTACEA)**. 210 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LANDNER, L.; REUTHER, R. **Metals in society and in the environment: a critical review of current knowledge on fluxes, speciation, bioavailability and risk for adverse effects of copper, chromium, nickel and zinc**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 406, 2005.

LLOYD, 1961 apud, EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **O uso do sulfato de cobre em ecossistemas aquáticos: fatores que afetam sua toxicidade em peixes de água doce**. Jaguariúna, São Paulo, 102 p., 2013.

LOPES, C. et al. Toxicity of ivermectin on cladocerans: comparison of toxic effects on *Daphnia* and *Ceriodaphnia* species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 10, 2009.

MAGALHÃES, D. P. et al., Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. **Environmental Chemistry Letters**, v. 13, p. 69–87, 2015.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos**. Oecologia Brasiliensis, v. 12, p. 355-381, 2008.

MANSALO, A. S.; MOREIRA, R. A.; ROCHA, O. **Toxicidade aguda do agrotóxico carbofurano ao Cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* Daday**. In: IX Fórum Ambiental da Alta Paulista, v. 9, n. 11, 2013, p. 91-103, 2013.

MARCHI, G. et al. **Elementos-traço e sua relação com qualidade e inocuidade de fertilizantes, corretivos agrícolas e resíduos orgânicos no Brasil**. EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Planaltina, Distrito Federal, 45 p., 2009.

MARTINS, C. A. S. et al. A Dinâmica de metais-traço no solo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, n. 3-4, p. 383-391, 2011.

MASUTTI, M. B. **Distribuição e efeitos de cromo e cobre em ecossistemas aquáticos: uma análise laboratorial e “in situ” (experimentos em micro e mesocosmos)**. 370 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

MEYER, J. S. et al. Acute toxicity of binary and ternary mixtures of Cd, Cu, and Zn to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 799–808, 2015.

NADDY, R. B.; COHEN, A. S.; STUBBLEFIELD, W. A. The interactive toxicity of cadmium, copper, and zinc to *Ceriodaphnia dubia* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 809-815, 2015.

NIKINMAA, M. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. Elsevier Inc. 252 p., 2014.

NOGUEIRA, T. D. **Efeitos Agudos de Efluentes Líquidos Industriais**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento Ambiental) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

NOVELLI, A. **Estudo liminológico e ecotoxicológico da água e sedimentos do rio Monjolinho – São Carlos (SP), com ênfase nas substâncias de referência cádmio e cobre**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo LTDA. 3 ed. 79 p., 2008.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; LOPES, R. M.; PAUMGARTTEN, F. J. R. P. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. **Chemosphere**, v. 56, p. 369-374, 2004.

PAVLAKI, M. D. et al. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 74, p. 99–110, 2011.

SILVA, D. C. V. R da; POMPÊO, M.; PAIVA, T. C. B.; A Ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. In: POMPÊO, et al. (Org.). **Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. p. 340-353, 2015.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. 2 ed., Taylor & Francis p. ,1995. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?id=YDqDy4bkW2QC&printsec=frontcover&dq=fundamentals+of+aquatic+toxicology&hl=en&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?id=YDqDy4bkW2QC&printsec=frontcover&dq=fundamentals+of+aquatic+toxicology&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)>. Acesso em: 11 nov. 2015.

RAINBOW, P. S. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. **Environment International**, v. 33, p. 576–582, 2007.

ROSA, G. A. **Estudos dos efeitos do fármaco propranolol para *Ceriodaphnia silvestrii* (CLAROCERA, CRUSTACEA) com ênfase em efeitos nas populações**. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SALOMONS, W.; FORSTNER, U. **Metals in the hydrocycle**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 349 p., 1984.

SANTOS, M. A. P. F. **Influência de substâncias húmicas nas características bionômicas, toxicidade e bioacumulação de cobre por *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera)**. 2004. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2004.

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios de toxicologia ambiental**. Rio de Janeiro: Interciência Ltda. p. 17-24, 2013.

SHAW, J. R. et al. Comparative toxicity of cadmium, zinc, and mixtures of cadmium and zinc to Daphnids. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 182–189, 2006.

TAVARES, K. P. et al. Acute toxicity of copper and chromium oxide nanoparticles to *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 9, n. 1, p. 43-50, 2014.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, M. T. **Recursos Hídricos no Século XXI**. São Paulo: Oficina de Textos. p. 54-99, 2011.

TRUHAUT, René. Ecotoxicology: objectives principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, p. 151-171, 1977.

TWISS, M. R. et al. Coupling the use of the computer chemical speciation models and culture techniques in laboratory investigation of trace metal toxicity. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v. 13, p. 9-24, 2001.

VAZ, A. J.; LIMA, I. V. **Metais: gerenciamento da Toxidade. Imunotoxicologia dos Metais**. In: AZEVEDO, F. A. & CHASIN, A. A. M. (Org.). São Paulo: Editora Ateneu. p. 399-414, 2003.

VERSTEEG, J. D. et al. *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. **Chemosphere**, v. 34, n. 4, p. 869-892, 1997.

WEN-XIONG, W. Prediction of metal toxicity in aquatic organisms. **Chinese Science Bulletin**, v. 58, n. 2, p. 194-202, 2013.

WILDE, K. L et al. The Effect of pH on the Uptake and Toxicity of Copper and Zinc in a Tropical Freshwater Alga (*Chlorella* sp.). **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, v. 51, p. 174-185, 2006.

WHO (World Health Organization). **Copper in drinking water: background**. 23 p., 2004.

WHO (World Health Organization). **Zinc**. (Environmental Health Criteria 221). ISBN 92 4 157221 3. ISSN 0250-863X. Geneva, 2001.

WOOD, C. M. **An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. homeostasis and toxicology of essential metals**. In: WOOD, Chris M.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. Canada: Academic Press. v. 31A, p. 1–51, 2011.

Yi, X.; Kang, S.; Jung, J. Long-term evaluation of lethal and sublethal toxicity of industrial effluents using *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. **Journal of Hazardous Materials**, v.178, p. 982–987, 2010.

YIM, J. H.; KIM, K. W.; KIM, S. D. Effect of hardness on acute toxicity of metal mixtures using *Daphnia magna*: Prediction of acid mine drainage toxicity. **Journal of Hazardous Materials**, p. 16-21, 2006.

ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2 ed. São Carlos: RiMa, p. 1-13, 2008.



# APÊNDICE A – Resultados dos testes de sensibilidade

Tabela A1 - Apresentação dos valores de CE50;48h e de seus respectivos intervalos de confiança referentes aos testes de sensibilidade para *Daphnia similis*, utilizando cloreto de sódio como substância de referência.

Data	CE50;48h (g.L <sup>-1</sup> )	Intervalo de Confiança (95%)
05/2015	1,624	1,335 – 1,976
07/2015	2,160	1,782 – 2,619
08/2015	2,080	1,482 – 2,919
09/2015	2,378	1,966 – 2,877
10/2015	2,012	1,723 – 2,349
<b>Média:</b> 2,051 g.L <sup>-1</sup>		
<b>Desvio Padrão:</b> 0,275 g.L <sup>-1</sup>		
<b>Faixa de Sensibilidade:</b> 1,50 – 2,60 g.L <sup>-1</sup>		
<b>Coefficiente de Variação:</b> 13,43 %		

Tabela A2 - Apresentação das CE50;48h médias e de seus respectivos intervalos de confiança referentes aos testes de sensibilidade para *Ceriodaphnia silvestrii*, utilizando cloreto de sódio como substância de referência.

Data	CE50;48h (g.L <sup>-1</sup> )	Intervalo de Confiança (95%)
05/2015	1389,51	1,30 – 1,48
07/2015	1140,18	0,75 – 1,72
08/2015	1106,18	1,05 – 1,16
09/2015	1369,79	1,30 – 1,45
<b>Média:</b> 1,25 g.L <sup>-1</sup>		
<b>Desvio Padrão:</b> 0,15 g.L <sup>-1</sup>		
<b>Faixa de Sensibilidade:</b> 0,95 - 1,55 g.L <sup>-1</sup>		
<b>Desvio Padrão:</b> 0,15 mg.L <sup>-1</sup>		
<b>Coefficiente de Variação:</b> 11,90 %		

## APÊNDICE B – Registros dos ensaios ecotoxicológicos de toxicidade aguda

Tabela B1 – Registro de dados do teste agudo com cobre para *Daphnia similis*, iniciado no dia 27/10/15, com duração de 48 horas.

Amostra (µg/L)	Organismos imóveis					Efeito Total
	1	2	3	4	5	
Controle	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
5	0	1	0	1	0	2
9	1	1	2	1	1	6
13	1	2	3	0	2	8
17	2	3	2	3	3	13
21	5	5	5	5	5	25

Tabela B2 – Registro de dados do teste agudo com cobre para *Daphnia similis*, iniciado no dia 06/10/15, com duração de 48 horas.

Amostra (µg/L)	Organismos imóveis					Efeito Total
	1	2	3	4	5	
Controle	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
5	2	0	1	0	0	3
9	0	0	1	1	1	3
13	1	1	2	2	1	7
17	3	3	3	2	3	14
21	5	5	5	5	5	25

Tabela B3 - Registro de dados do teste agudo com cobre para *Ceriodaphnia silvestrii* iniciado no dia 07/10/15, com duração de 48 horas.

Amostra (µg/L)	Organismos imóveis					Efeito Total
	1	2	3	4	5	
Controle	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
7	0	1	0	1	0	2
9	1	1	2	1	2	7
11	5	5	5	5	4	24

Tabela B4 – Registro de dados do teste agudo com cobre para *Ceriodaphnia silvestrii* iniciado no dia 06/10/15, com duração de 48 horas.

Amostra (µg/L)	Organismos imóveis					Efeito Total
	1	2	3	4	5	
Controle	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
7	1	1	0	0	1	3
9	1	4	3	3	3	14
11	5	5	5	5	5	25

Tabela B5 – Registro de dados do teste agudo com zinco para *Daphnia similis*, iniciado no dia 28 /10/15, com duração de 48 horas.

Amostra (µg/L)	Organismos imóveis					Efeito Total
	1	2	3	4	5	
Controle	1	0	0	0	0	1
10	1	0	0	0	0	1
20	0	1	2	2	1	6
40	3	3	4	5	4	19
80	4	5	4	5	3	21
160	5	4	5	5	5	24
320	5	5	5	5	5	25

Tabela B6– Registro de dados do teste agudo com zinco para *Daphnia similis*, iniciado no dia 03/11/15, com duração de 48 horas.

Amostra (µg/L)	Organismos imóveis					Efeito Total
	1	2	3	4	5	
Controle	1	0	0	0	0	1
10	0	0	0	0	0	0
20	1	3	0	1	2	7
40	2	2	2	3	2	11
80	2	4	4	4	5	19
160	5	4	5	4	4	22
320	5	5	5	5	5	25

Tabela B7– Registro de dados do teste agudo com zinco para *Ceriodaphnia silvestrii*, iniciado no dia 07/11/15, com duração de 48 horas.

Amostra (µg/L)	Organismos imóveis					Efeito Total
	1	2	3	4	5	
Controle	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	1	1
20	0	0	0	1	0	1
40	1	1	2	1	1	6
80	4	3	4	5	4	20
160	5	5	5	5	5	25

Tabela B8 – Registro de dados do teste agudo com zinco para *Ceriodaphnia silvestrii*, iniciado no dia 28/10/15, com duração de 48 horas.

Amostra (µg/L)	Organismos imóveis					Efeito Total
	1	2	3	4	5	
Controle	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0	1
20	2	1	1	0	2	6
40	2	3	2	2	2	11
80	2	4	3	4	3	16
160	5	5	5	5	5	25

Tabela B9 – Registro de dados do teste agudo da mistura de cobre e zinco para *Daphnia similis*, iniciado no dia 12/11/15, com duração de 48 horas.

Concentração de Cu + Zn (µg/L)	Organismos imóveis							Efeito Total
	1	2	3	4	5	6	7	
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0
1 + 10	0	0	0	1	0	0	0	1
5 + 20	0	0	0	0	1	0	1	2
9 + 40	1	2	4	3	3	2	5	20
13 + 80	5	5	5	5	5	5	5	35
17 + 160	5	5	5	5	5	5	5	35

Tabela B10 – Registro de dados do teste agudo da mistura de cobre e zinco para *Ceriodaphnia silvestrii*, iniciado no dia 12/11/15, com duração de 48 horas.

Concentração de Cu + Zn (µg/L)	Organismos imóveis							Efeito Total
	1	2	3	4	5	6	7	
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0
1 + 5	0	0	0	0	0	0	0	0
3 + 10	0	0	0	0	1	0	0	1
5 + 20	2	0	3	1	2	1	0	9
7 + 40	5	5	5	5	5	5	5	35
9 + 80	5	5	5	5	5	5	5	35